

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Ciencias Ambientales
Universidad de Cádiz
2013-2014

Estudios de bioacumulación de un metal de interés en contaminación ambiental (plomo) en larvas de lubina de gran valor comercial



Alumno: José Óscar Coto Reyes
Tutoras: Estrella Espada Bellido y M^a Dolores Galindo Riaño

El trabajo de investigación presentado en este Trabajo Fin de Grado ha sido realizado en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias y gracias a la financiación recibida por el proyecto “Bioindicadores de contaminación metálica en sistemas acuáticos. Criterios de calidad ambiental asociados a alteraciones histopatológicas y bioquímicas en peces de interés comercial”, cofinanciado por la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia RNM-6641) y por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto CTM 2010-17474).

Es difícil llegar a esta etapa académica sin el gran apoyo de las personas que te rodean a lo largo de duros años, algunas se quedaron por el camino y otras siguen a mi lado, por lo que quisiera expresar mi gratitud a los que me han ayudado de forma incondicional.

En primer lugar, agradecer a mis tutoras del proyecto, Dra. Dña. María Dolores Galindo Riaño por el gran esfuerzo realizado y ayudarme en todo lo que ha sido necesario y Dra. Dña. Estrella Espada Bellido por creer en mí desde mi etapa de colaboración, aconsejándome en todo y ayudándome con una gran dedicación, transmitiéndome una ilusión y vocación por la investigación que hizo que este proyecto fuese motivador y enormemente instructivo, una ilusión al alcance sólo de los verdaderos apasionados por la docencia.

A mis compañeros de Geoquímica Marina durante estos dos años, María Dolores Granado, Marga, Hafida, Bahija, Clara, Paco, Eva, María y Ana, por la enorme ayuda desinteresada y la paciencia, creando un ambiente de trabajo y amistad el cual espero tener la suerte de volver a encontrar a lo largo de mi vida laboral.

Cuando entras en la universidad te dicen que más que una carrera haces grandes amistades, en mi caso este hecho tiene un nombre: Pedro Amador Guiral. No imagino los años de duro trabajo sin su gran apoyo, asesoramiento y sincera amistad en todo momento pese a los durísimos años que ha ido superando, siendo para mí un gran ejemplo a seguir en todos los aspectos de la vida.

A todos mis compañeros de clase, sin olvidar a los Sénecas y Erasmus, los cuales han hecho de la universidad una experiencia inolvidable, siendo algunos actualmente buenos amigos.

Hablando de amistades no puedo olvidar a mis amigos de toda la vida, María, Estefanía, Javier Mejías, Chema, Iván, Javier Martínez y Marcos, así como a amigos más recientes como Pablo o David, su apoyo incondicional en todo momento da significado a la palabra amistad, por lo que los considero hermanos.

Por último, agradecer a las personas a las que debo todo, mi familia. Mi madrina y abuelo Miguel por su apoyo, pero especialmente a mis padres y a mi hermano Enrique. Mis padres los cuales se han sacrificado enormemente para verme crecer como persona y proporcionarme un futuro, así como a mi hermano el cual siempre ha sido ese pilar rígido de madurez que me ha encauzado en algunos momentos de mi vida, deseándole que tenga suerte en todos los proyectos que tiene en su futuro próximo.

Muchas gracias a todos.

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
3.1 Importancia de los metales pesados en el medio acuático	3
3.2 El plomo.....	6
3.3 Generalidades de la lubina.....	7
3.4 Ensayos de bioacumulación.....	8
3.5 Legislación Ambiental.....	8
4. Objetivos.....	9
5. Antecedentes.....	11
6. Material y Métodos.....	12
6.1. Diseño del bioensayo.....	12
6.2. Ensayo de bioacumulación con plomo en larvas de lubina.....	14
6.3. Metodología de la toma de muestras.....	14
6.3.1. Muestras de agua.....	15
6.3.2. Muestras de larvas.....	16
6.4. Análisis de aguas.....	16
6.4.1. Análisis del carbono orgánico disuelto (COD).....	16
6.4.1.1. Análisis del contenido de carbono total.....	16
6.4.1.2. Análisis del contenido de carbono inorgánico.....	16
6.4.2. Análisis de Pb.....	17
6.5. Análisis del contenido metálico en tejidos de larvas.....	19
6.5.1. Pretratamiento de las muestras biológicas.....	19
6.5.2. Análisis de las muestras biológicas.....	21
7. Resultados y Discusión.....	21
7.1 Parámetros físico-químicos en los tanques de los bioensayos.....	21
7.2 Carbono orgánico disuelto (COD).....	23
7.3 Análisis de plomo en agua.....	23
7.4 Análisis de plomo en larvas de lubina.....	26
7.5 Estudio comparativo de bioacumulación de Pb con larvas de dorada.....	27

8. Conclusiones.....	29
Bibliografía.....	30
Anexos.....	33
Anexo 1. Análisis de Pb en aguas.....	33
Anexo 2. Análisis de Pb en muestras biológicas.....	35
Anexo 3. Validación de los métodos.....	35

1. RESUMEN

La contaminación por metales pesados es uno de los mayores problemas ambientales en la actualidad debido a su alto grado de persistencia en el medio y su tendencia a la bioacumulación en la cadena trófica, por lo que son considerados un riesgo importante para los seres vivos. Estos metales, entre los que destaca el plomo, son considerados extremadamente peligrosos para la vida dada su elevada toxicidad incluso a bajas concentraciones.

Por ello, en el presente trabajo de fin de grado, se propuso estudiar a escala de laboratorio la bioacumulación de plomo en larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*, Linneaus 1758), el cual es un estadio muy sensible a los efectos externos. Para ello, se diseñó un ensayo de bioacumulación cuyos organismos seleccionados fueron expuestos a diferentes concentraciones de este metal durante periodos de 24 y 96 h realizando dos réplicas de cada concentración estudiada. Este metal se adicionó como acetato de plomo ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) en los tanques de ensayo con concentraciones de 0 (control); 0,01; 0,1; 1 y 10 mg/L de sal, con objeto de estudiar la bioacumulación producida por diferentes concentraciones de plomo en las larvas con respecto al tiempo de exposición.

Durante la realización de los bioensayos se controlaron diariamente los parámetros físico-químicos de los tanques (temperatura, pH, salinidad, sólidos disueltos totales (STD), conductividad y oxígeno disuelto del agua de cada tanque) para evitar que su alteración afectara negativamente el hábitat de las larvas. También se evaluó el carbono orgánico disuelto (COD) de las muestras de agua a las 0, 24 y 96 horas, con el fin de hacer un seguimiento del contenido en materia orgánica de los tanques.

Por otro lado, se realizó un seguimiento de las concentraciones de plomo en el agua de los tanques controlando su concentración en disolución durante los test de bioacumulación, permitiendo realizar una correlación entre el metal disuelto y su efecto sobre las larvas. Para ello, las muestras de aguas de los tanques con menor concentración de sal (0; 0,01 y 0,1 mg/L) se analizaron mediante Voltamperometría de Redisolución Anódica de Impulso Diferencial (DPASV), mientras que las muestras con mayor concentración de sal (1 y 10 mg/L) fueron analizadas empleando la Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-AES), debido a los diferentes límites de detección de ambas técnicas.

Por último, se realizó un pretratamiento de las muestras de larvas obtenidas a las 24 y 96 h de exposición al contaminante mediante liofilización y digestión ácida, las cuales fueron posteriormente analizadas por Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) con el fin de realizar los estudios de bioacumulación de Pb (mg/Kg) en las muestras biológicas.

A partir de los resultados obtenidos se pudieron establecer las relaciones existentes entre los niveles de metal adicionados en los test de toxicidad presentes en las aguas y las concentraciones de metal bioacumuladas en las muestras biológicas.

Abstract

2. ABSTRACT

Heavy metals contamination is nowadays one of the biggest environmental concerns, due to its high persistence in the area and its tendency to the bioaccumulation in the food chain. Therefore, it is considered as an important risk for the living beings. These metals, especially lead, are considered extremely dangerous for life because of its high toxicity even at low concentrations.

Thus, the present Bachelor's degree Final Project studies at laboratory scale lead bioaccumulation in larvae sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linneaus 1758), which is very sensitive to the external effects. To this end, a bioaccumulation test was performed in which the selected organisms were exposed to different metals concentrations for periods of 24 and 96 hours performing two replicates of each studied concentration. This metal was added as lead acetate ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) to test tanks in salt concentrations of 0 (control); 0.01; 0.1; 1 and 10 mg/L, whose purpose was to study the bioaccumulation produced by different lead concentrations on the larvae with respect to the exposure time.

During the development of the biotests it was daily controlled the physical-chemical parameters of the tanks (temperature, pH, salinity, total dissolved solids (TDS), conductivity and dissolved oxygen from water in each tank) in order to prevent an alteration which could affects adversely the larvae habitat. Also it was evaluated the dissolved organic carbon (DOC) from the water samples collected at 0, 24 and 96 hours, for the purpose of tracking the water quality by measuring the organic material present in the tanks.

Furthermore, lead concentrations in solution in the test tanks were controlled during the bioaccumulation tests, allowing a correlation between the dissolved metal and its effect over the larvae. For that, water samples with lower concentrations of metal (0; 0.01 and 0.1 mg/L) were analysed by Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry (DPASV), while the higher metal concentration water samples were measured by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES), due to the different detection limits of both techniques.

Finally, a pretreatment of the larvae samples collected at 24 and 96 hours of exposure to the pollutant was performed by lyophilisation and acid digestion, which were analysed by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) in order to study the lead bioaccumulation (mg/Kg) in the biological samples.

On the basis of the results obtained, a correlation between the added metal level in the water toxicity tests and the bioaccumulated metal concentrations in the biological samples was established.

Introducción

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Importancia de los metales pesados en el medio acuático

La alimentación, higiene y actividades del ser humano, así como la agricultura y la industria no serían posibles sin un recurso vital como es el agua. Sin embargo, en los últimos años el desarrollo de la industria y el rápido crecimiento de la población humana, junto al uso en aumento de abonos y plaguicidas en agricultura han influido de manera considerable en el deterioro de la calidad de las aguas naturales acrecentándose los problemas de contaminación [Fairbrother, 2007]. Por tanto, se hace necesario conocer las posibles causas y fuentes de contaminación del medio hídrico para poder adoptar soluciones, así como conocer el efecto que tienen los contaminantes sobre el medio natural y los organismos que viven en él, prestando especial atención al grupo de contaminantes formados por los metales pesados, definidos como aquellos elementos que presentan una densidad superior a 5 g/cm^3 [Fairbrother, 2007].

Los metales pesados presentan cinco aspectos fundamentales que los caracterizan y los diferencian de otros elementos y compuestos químicos:

- Son constituyentes naturales del medio ambiente y su concentración varía según el área geográfica donde se encuentren.
- Todos los ecosistemas contienen mezclas naturales de metales y éstos entran a menudo en la naturaleza en forma de mezclas, por lo que se debe prestar especial atención a los efectos sinérgicos, antagónicos o aditivos que pueden presentar.
- Algunos metales son esenciales para la salud humana, de los animales, plantas y microorganismos. Se pueden producir efectos adversos tanto si existen deficiencias como excesos de estos metales esenciales en los organismos.
- La química de los metales influye notablemente en su destino y en los efectos que pueden causar en humanos y demás receptores ecológicos. A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales no se crean ni se destruyen mediante procesos químicos o biológicos, sin embargo, estos procesos pueden transformar los metales modificando su estado de oxidación o convirtiéndolos en derivados orgánicos o inorgánicos, lo que puede incluso potenciar sus efectos adversos.
- La toxicocinética y toxicodinámica de los metales dependen del metal, la forma del metal o del compuesto metálico y la capacidad del organismo de regular y/o acumular el metal.

Dado que sus concentraciones en aguas naturales suelen encontrarse a niveles inferiores a 1 mg/L, se incluyen dentro del grupo conocido como elementos traza, contaminantes que a pesar de sus bajos niveles de concentración poseen importantes implicaciones a nivel químico y biológico en los sistemas acuáticos naturales [Cámara y Pérez-Conde, 2011].

Los metales pesados se clasifican a su vez en dos grupos, el primero engloba a los denominados esenciales u oligoelementos, los cuales son requeridos en pequeñas cantidades para que los organismos vivos completen su ciclo vital y que pueden ser tóxicos pasado un cierto umbral. El segundo grupo está constituido por aquellos metales pesados que no presentan una función biológica conocida y que, al igual que los anteriores, resultan tóxicos cuando se supera un determinado nivel.

En el medioambiente los metales pesados pueden tener un origen natural cuando proceden del material originario (minerales como la Augita o el Apatito contienen trazas de plomo) o a través de aportes atmosféricos (como las erupciones volcánicas), o un origen antropogénico cuando provienen de actividades humanas contaminantes tales

como la industria o la agricultura [Apte, 2002]. Los ecosistemas acuáticos son los más sensibles, ya que numerosos factores tales como erupciones volcánicas o emisiones hidrotermales en las profundidades oceánicas pueden alterar la concentración y distribución natural de los metales pesados en el agua (*Tabla 1*) [Censi, 2006].

Tabla 1: *Intervalos de concentración ($\mu\text{g/L}$) característicos de plomo, zinc y cadmio en aguas de río, costeras y oceánicas [Crompton 2007]*

Metal	Aguas de río		Aguas costeras, bahías y estuarios		Aguas oceánicas superficiales	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max
Pb	0,13	0,60	0,038	7,44	0,00004	9,00
Zn	0,86	6,3	0,007	200	0,05	10,9
Cd	0,03	0,05	0,015	5	0,01	0,13

Los metales pesados son empleados en una gran variedad de productos industriales que a largo plazo tienden a ser depositados en los distintos compartimentos medioambientales. Dicha liberación de metales pesados en el medioambiente se produce desde el principio de la cadena de producción (debido a las actividades de minería con minerales), durante la producción mediante el uso de los productos industriales que los contienen, y también al final de la cadena de producción.

Los organismos concentran estos contaminantes en sus tejidos mediante un proceso denominado **bioacumulación**, que implica el aumento progresivo de la cantidad de sustancia en los tejidos de un organismo como consecuencia de que la velocidad de absorción supera la capacidad del organismo para eliminar dicha sustancia. El grado de acumulación depende de factores tales como la naturaleza química del contaminante, el tipo de organismo, su estado fisiológico, la temperatura del agua y la salinidad.

Asimismo, se emplean ciertos términos que describen la conducta de los contaminantes en relación con los sistemas biológicos [Nordberg, 2009], definiéndose como **bioconcentración** al proceso por el cual la concentración de una sustancia en un organismo aumenta con respecto a la que tiene el ambiente al que está expuesto, debido al consumo de tejidos contaminados u otros medios, estableciéndose una relación entre la incorporación de metales al organismo vivo y el medio abiótico en el que habita [Campbell, 2002].

Dicha relación se agrava cuando los contaminantes se incorporan a la cadena alimenticia produciéndose procesos de **biomagnificación**, el cual se produce cuando la concentración de una sustancia se ve incrementada en los organismos situados en niveles superiores de la cadena trófica, con respecto a aquellos organismos que se encuentran en niveles inferiores. Si la bioacumulación ocurre en cada transferencia a niveles tróficos superiores, la concentración del contaminante aumenta.

Por último, se denomina **biodisponibilidad** al grado de absorción y accesibilidad de los metales pesados hacia los organismos vivos. La biodisponibilidad de los metales hacia los organismos es determinada por factores fisicoquímicos y factores propios de los organismos [Campbell, 2002].

3.2. El plomo

El plomo representa aproximadamente el 0,002 % de la corteza de la tierra considerándose junto a sus compuestos, uno de los metales contaminantes más extendido, encontrándose en agentes antidetonantes, baterías de plomo-ácido, pigmentos, vidrios, cerámica, plásticos, aleaciones, láminas, cables, soldadura y tuberías, siendo altamente dañino para el medio natural desde un punto de vista toxicológico. Un hecho a destacar, fue el adelanto por el Gobierno Español de la fecha de prohibición de comercialización de gasolinas con plomo en todo el territorio nacional, sustituyéndolas por una mezcla de hidrocarburos de origen mineral y de compuestos oxigenados orgánicos. En base a su grado de afinidad con la materia particulada, se califica al plomo como un metal depositable, ya que presenta un elevado grado de afinidad por la materia particulada [Whitfield, 1987]. Las emisiones a la atmósfera de los metales traza suman un total de $7,5 \cdot 10^8$ Kg al año, siendo el plomo uno de los metales que se emiten en mayor cantidad a la atmósfera, con una tasa de descarga de $332 \cdot 10^6$ Kg al año (Tabla 2) [Domènech, 2006].

Tabla 2: Descargas globales de Pb en aire, agua y suelo [Domènech, 2006]

Elemento	Concentración (Tm/año)		
	Concentración en el Aire	Concentración en el Agua	Concentración en el Suelo
Pb	332	138	796

El envenenamiento agudo por plomo en humanos causa daños en el aparato urinario, aparato reproductor, cerebro y sistema nervioso, causando anemia y dolor muscular en los casos más leves [Stanley, 1993]. Dicha toxicidad ya fue reconocida hace más de 2000 años por el poeta griego Nicander, el cual describió la enfermedad conocida como plumbismo, la cual era producida por envenenamiento agudo de plomo [Förstner, 1979], datándose casos de envenenamiento por plomo poco frecuentes tales como en 1969 cuando una unidad militar británica estacionada en Hong Kong sufrió de vómitos severos, daños intestinales y desórdenes circulatorios al usar cromato de plomo para mejorar la coloración en una especia de curry.

En ecosistemas marinos, los datos respecto a la toxicidad del plomo son confusos debido a la relativa insolubilidad de los compuestos de este metal, es por ello que se han descrito efectos adversos muy variados y en algunos casos opuestos, no obstante, se afirma que los organismos marinos son más resistentes que los dulceacuícolas [Cromton, 2007].

3.3. Generalidades de la lubina (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758)

La lubina es un perciforme de la familia de los Serránidos, cuyo nombre científico es *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) y es el máximo exponente de la acuicultura mediterránea con una producción superior a los 118.000 Tm al año [Ortega, 2013].

Presenta una morfología de cuerpo alargado, vigoroso y está provisto de escamas grandes, con cabeza puntiaguda y una boca grande, terminal y ligeramente retráctil. Tiene dos aletas dorsales (una de forma triangular y otra de forma irregular), una aleta anal y una aleta caudal (de forma ahorquillada), todas ellas con numerosos radios espinosos (*Figura 1*).

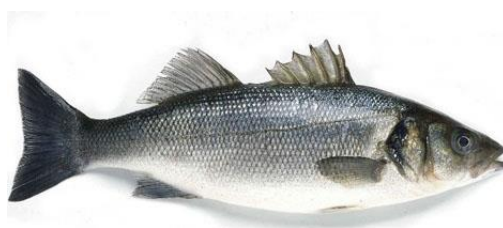


Figura 1: *Ejemplar adulto de Lubina (Dicentrarchus labrax)*

De color gris plumizo, más oscuro en la parte dorsal, amarillento en la parte ventral y

laterales plateados, alcanza una talla máxima entre los 80-100 cm, siendo más comunes tallas comprendidas entre los 40 y los 55 centímetros [Ortega, 2013]. No presentan dimorfismo sexual, aunque las hembras tienen la cabeza más larga y el cuerpo es más alto que el de los machos, crecen más rápidamente y alcanzan mayor tamaño. Es una especie de aguas costeras poco profundas que suelen vivir agrupadas cuando son jóvenes, y en solitario o en parejas cuando son adultas, encontrándose cerca de las costas rocosas y en las desembocaduras de los ríos y salinas, penetrando en los estuarios y remontando parcialmente a los ríos. La lubina es un predador muy activo cuya alimentación se basa fundamentalmente en otros peces, cefalópodos, langostinos y otros cretáceos, caracterizándose por ser una especie eurihalina y euriterma [Ortega, 2013].

3.4. Ensayos de bioacumulación

Los efectos tóxicos inducidos químicamente en organismos acuáticos nos sirven como indicadores de riesgo toxicológico para el ser humano y el medio ambiente, por lo que la toxicidad de un contaminante (o varios) sobre los organismos se puede evaluar mediante ensayos de toxicidad y bioacumulación en organismos tanto de agua dulce como marinos [Jones, 2009]. En dichos ensayos, los organismos se someten a distintas concentraciones de contaminante durante un cierto período de exposición bajo condiciones estándares, transcurrido el cual, se comprueba el efecto producido sobre los mismos. Estos ensayos son la principal fuente de información respecto a la evaluación toxicológica de los efectos de los contaminantes, ya que se consigue comparar la sensibilidad de una o más especies a distintos tóxicos o a diferentes condiciones para el mismo tóxico [Crompton, 2007]. Es por ello que la realización de bioensayos en las evaluaciones ecotoxicológicas para el estudio del medio acuático es considerada de gran importancia, pues se integra con la biología y genera información analítica sobre los efectos de la exposición de un sistema vivo a sustancias contaminantes en un ambiente alterado [Ossana, 2011].

3.5. Legislación ambiental

La Unión Europea establece un marco legislativo al que se deben adaptar todos los países miembros de la misma y que hace referencia a la calidad de las aguas y al uso que de ellas se hace, siendo la Directiva 2000/60/CE, de 23 de octubre de 2000, (DOCE núm. L327/1, de 22 de diciembre de 2000), conocida como la Directiva marco del agua o DMA, la norma estipulada por el Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión

Europea por la que se establece un marco de actuación comunitario de protección en el ámbito de la política de aguas continentales, aguas de transición, aguas costeras y aguas subterráneas, considerando esta directiva el agua como un patrimonio que hay que proteger, defender y tratar como tal y tiene como principal objetivo evitar que sea tratada como bien comercial [Cerviño, 2007]. En la Decisión 2445/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de noviembre de 2000 (DOCE núm. L331/1, de 15 de diciembre de 2001) se aprobó la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la Política de Aguas, que posteriormente fue modificada por la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008 (DOUE núm. L348/84, de 24 de diciembre de 2008), según la cual el plomo y sus compuestos están incluidos como sustancias prioritarias.

En España fue transpuesta al marco legislativo estatal a través del artículo 129 de la Ley 62/2003, de 30 de diciembre de 2000, de Medidas Fiscales, Administrativas y del Orden Social, que modificó el Texto Refundido de la Ley de Aguas (Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de Julio, BOE núm. 176, de 24 de julio de 2001) [Cerviño, 2007]. En el año 2010 entró en vigor la nueva Ley 41/2010, de 29 de diciembre, de protección del medio marino (BOE núm 317, de 30 de diciembre de 2010), que incorpora al derecho español la Directiva marco sobre Estrategia Marina (Directiva 2008/56/CE) por la que se introduce la obligación de lograr un buen estado ambiental de las aguas marinas europeas. En el año 2011 se produjo un nuevo avance en la protección de las aguas, ya que se aprobó el Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas (BOE núm. 19, de 22 de enero de 2011). Con este nuevo real decreto, se actualiza la legislación española que recoge las normas de calidad ambiental de las sustancias preferentes, las cuales presentan un riesgo significativo debido a su especial toxicidad o bioacumulación.

Objetivos

4. OBJETIVOS

El objetivo fundamental del presente Trabajo Fin de Grado es el estudio de la bioacumulación de un metal tóxico como el plomo en lubinas en estado larvario, por ser una especie de alto valor comercial y el estadio más sensible hacia los contaminantes. Para la consecución de dicho objetivo fundamental se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- a) Desarrollo de bioensayos de laboratorio en tanques de ensayo con larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*), para el estudio de la bioacumulación de Pb(II) mediante la adición de acetato de plomo ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$).
- b) Control diario de los parámetros físico-químicos en los tanques de ensayo con el fin de monitorizar el medio donde se encuentran las larvas y detectar posibles alteraciones.
- c) Cuantificación de los niveles de concentración de plomo en los tanques de ensayo durante los test de toxicidad, haciendo un control del elemento disuelto en el agua.
- d) Cuantificación de los niveles de concentración de plomo acumulado en los tejidos de las larvas de la especie analizada, sometidas a las diferentes concentraciones del contaminante.
- e) Discusión de los resultados obtenidos durante el bioensayo, valorando la influencia de la concentración de plomo en el agua sobre la bioacumulación de este elemento en la especie estudiada.

Este trabajo también se plantea como metodología de aprendizaje destacando con especial énfasis la aplicación de conocimientos adquiridos en el Grado en las siguientes competencias:

- f) Aprendizaje avanzado del manejo de diferentes técnicas instrumentales para el análisis de concentraciones de metal en las muestras de agua y larvas previamente digeridas, así como del contenido de carbono orgánico de las muestras de agua, destacando la Voltamperometría de Redisolución Anódica de Impulso Diferencial (DPASV), Espectroscopía de Emisión Atómica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-AES), Espectrometría de Masas con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) y el analizador elemental de carbono (TOC).
- g) Aplicación del proceso analítico durante los ensayos de bioacumulación de plomo en etapas como: la toma y conservación de muestras de larvas y de aguas mediante el protocolo “manos sucias, manos limpias” entre otros, el pretratamiento de las muestras de agua mediante digestión por radiación ultravioleta y H_2O_2 , y de las muestras de larvas mediante liofilización y digestión ácida por microondas, así como durante el tratamiento de los datos analíticos obtenidos aplicando diversas herramientas quimiométricas.

5. ANTECEDENTES

Tras revisiones bibliográficas, se han encontrado varios estudios de bioacumulación de metales pesados, como el plomo en peces, debido a la gran influencia que ejercen sobre el deterioro ambiental y su impacto sobre los humanos.

En relación con la bioacumulación de plomo existen algunos estudios entre los que destaca el realizado con muestras en la fase adulta o juvenil de lubina, adquiridas en un mercado de abastos central de Turquía de forma mensual, comparando los resultados con los límites estatales de riesgo de cáncer, realizándose los análisis por las técnicas utilizadas en el presente trabajo fin de grado [Yaman, 2014]. De igual modo, estos mismos autores realizaron el mismo estudio con ejemplares adultos de doradas, pudiéndose realizar una comparativa entre ambas especies, observándose que los valores de contaminante que presentan los ejemplares de peces analizados no constituyen un riesgo para la salud humana [Yaman, 2013].

También se han estudiado otros metales como mercurio y su efecto en estudios de bioacumulación en juveniles de lubina expuestos a sedimentos contaminados por mercurio [De domenico, 2013], así como estudios de bioacumulación en ejemplares adultos de esta misma especie con muestras ricas en PAH (hidrocarburos aromáticos policíclicos) [Morgane Danion, 2011].

Como conclusión, se observa que los estudios actuales se centran en los efectos cancerígenos de los metales y derivados, debiéndose realizar más investigaciones de los efectos perjudiciales que los metales pesados generan sobre el medio ambiente.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Diseño del bioensayo

El estudio se llevó a cabo mediante el diseño de test estáticos de toxicidad aguda, en los cuales se colocaron larvas de la especie seleccionada, lubinas (*Dicentrarchus labrax*), que fueron expuestas a diferentes concentraciones del contaminante durante 24 y 96 h. Para los ensayos se emplearon aproximadamente 1050 ejemplares, de entre 0,10 y 0,4 cm de longitud total media y 0,075 g de peso medio, obtenidos de los tanques de cría del laboratorio de Cultivos Marinos del Centro Andaluz de Estudios Marinos (CASEM) de la Universidad de Cádiz.

Los test de toxicidad con plomo fueron realizados del 7 al 11 de abril de 2014 en estas instalaciones y los estudios se realizaron por duplicado, utilizándose un total de 20 tanques (dos series de tanques para los estudios de bioacumulación a las 24 h y a las 96 h), con 5 concentraciones distintas y dos réplicas de cada concentración, introduciéndose 50 ejemplares de larvas por tanque (*Figura 2*).



Figura 2: Tanques para los bioensayos de plomo con larvas de lubina

Antes del inicio del bioensayo, se tomaron muestras de ejemplares del tanque de cultivo para su tratamiento y posterior análisis como muestras de control (*Figura 3*).



Figura 3: *Larvas de lubina en el tanque de cultivo*

Durante el bioensayo se controlaron diariamente los siguientes parámetros físico-químicos: pH, oxígeno disuelto, conductividad/salinidad, sólidos totales disueltos y temperatura, los cuales se midieron directamente en los tanques de ensayo (*Figura 4*). Para ello se empleó una sonda multiparamétrica (HI 9828, Hanna Instruments).



Figura 4: *Medida de parámetros físico-químicos*

Las condiciones que se utilizaron para realizar el bioensayo fueron las siguientes:

- Sin renovación del agua.
- Fotoperiodo de luz/oscuridad de 12 horas.
- Con oxigenación.
- Alimentación de las larvas con aproximadamente 0,04 gramos de pienso comercial para larvas (NIPAI) por día y tanque.
- Volumen de tanques: 1,5 L.

6.2. Ensayo de bioacumulación con plomo en larvas de lubina

El compuesto químico empleado en el bioensayo fue acetato de plomo ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), adicionándose a los tanques concentraciones de 0; 0,01; 0,1; 1 y 10 mg/L de esta sal, lo que supone unas concentraciones de: 0; 0,0064; 0,064; 0,637 y 6,369 mg/L de Pb, respectivamente (Tablas 3 y 4).

Tabla 3: *Concentración de Pb adicionado en los tanques para el estudio a las 24h*

Nº Tanque	Tanque 1	Tanque 2	Tanque 3	Tanque 4	Tanque 5
Acetato de plomo (mg/L)	Control	0,01	0,1	1	10
Pb (mg/L)	Control	0,0064	0,064	0,637	6,369
Nº Tanque	Tanque 6	Tanque 7	Tanque 8	Tanque 9	Tanque 10
Acetato de plomo (mg/L)	Control	0,01	0,1	1	10
Pb (mg/L)	Control	0,0064	0,064	0,637	6,369

Tabla 4: *Concentración de Pb adicionado en los tanques para el estudio a las 96 h*

Nº Tanque	Tanque 11	Tanque 12	Tanque 13	Tanque 14	Tanque 15
Acetato de plomo (mg/L)	Control	0,01	0,1	1	10
Pb (mg/L)	Control	0,0064	0,064	0,637	6,369
Nº Tanque	Tanque 16	Tanque 17	Tanque 18	Tanque 19	Tanque 20
Acetato de plomo (mg/L)	Control	0,01	0,1	1	10
Pb (mg/L)	Control	0,0064	0,064	0,637	6,369

6.3. Metodología de la toma de muestras

Una vez preparados los tanques de los test de toxicidad y transcurrido el tiempo correspondiente, se realizó la toma de muestras de aguas y larvas.

La toma de muestras se realizó de la siguiente manera: a las 0 horas, se tomaron muestras biológicas del tanque de cultivo para larvas y muestras de agua de cada uno de los tanques del bioensayo; a las 24 horas, se tomaron muestras biológicas y de agua de los tanques 1 a 10 y a las 96 horas, se tomaron muestras biológicas y de agua de los tanques 11 al 20.

6.3.1. Muestras de agua

Para evitar problemas de contaminación durante la toma de muestras de agua, especialmente en aquellas con baja concentración, se empleó el protocolo “manos sucias, manos limpias”.

El protocolo requiere la colaboración de dos personas, una de ellas denominada “manos sucias” (debe facilitar el material que va a ser utilizado en cada momento) y otra denominada “manos limpias” (debe mantener el mínimo contacto con el material y sólo toma los recipientes en los que se va a recoger la muestra), debiéndose llevar guantes de plástico en todo momento (*Figura 5*).



Figura 5: Toma de muestras de aguas aplicando el protocolo “manos sucias-manos limpias”

La metodología de la toma de muestras de aguas fue la siguiente:

- Se depositaron 100 mL de agua sin filtrar en botes de polietileno de igual capacidad para el análisis del metal (Pb), añadiéndose 0,2 mL de HNO_3 de calidad suprapur (Merck, Alemania) con objeto de que el ácido evite los posibles procesos de absorción del metal en las paredes del recipiente. Dichos botes se cerraron y se introdujeron en dos bolsas de plástico de cierre hermético y se congelaron a -20°C hasta su análisis.
- Igualmente, se recogieron 50 mL de agua sin filtrar en botellas de vidrio ámbar de igual capacidad para el análisis del COD (carbono orgánico disuelto); los recipientes fueron llenados al máximo para evitar la presencia de aire en el interior. Posteriormente, las muestras fueron filtradas antes de su análisis con filtros de nylon de $0,45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro lo antes posible y se procedió a su análisis.

6.3.2. Muestras de larvas

Las larvas recogidas de cada tanque de ensayo fueron lavadas con disolución salina (9 mg/L de NaCl en agua Milli-Q) y se agruparon en dos “pool” de 20 especies, conservándose las muestras en nitrógeno líquido a -80°C hasta el momento de realizar su pretratamiento y análisis. Del mismo modo, se hicieron dos “pool” de larvas que fueron tomadas de la pecera general, con la finalidad de conocer la concentración inicial de plomo en las larvas antes de iniciar estos bioensayos, considerándose como muestras control.

6.4. Análisis de aguas

6.4.1. Análisis del carbono orgánico disuelto (COD)

Para el análisis del contenido en COD en las muestras de aguas filtradas se utilizó un analizador de carbono (Analytic Jena 3100). Este equipo utiliza un método diferencial a través del cual se obtiene el contenido de COD por diferencia del contenido de carbono total y el contenido de carbono inorgánico, realizándose el siguiente procedimiento en el análisis de ambas concentraciones de carbono de las muestras:

6.4.1.1. Análisis del contenido de carbono total

- La muestra se coloca en el automuestreador, que introduce en el equipo 500 µL de la misma para inyectarlos en el horno vertical de cuarzo, el cual contiene un catalizador de platino en su relleno.
- El carbono procedente de la materia orgánica (orgánico e inorgánico) es transformado en CO₂ más vapor de agua en el horno a una temperatura de 800 °C.
- El CO₂ producido de dicha transformación se transporta a través de un flujo continuo de gas O₂ hacia un detector de infrarrojos donde se determina (a partir de un calibrado realizado con una mezcla de carbonato/bicarbonato) la concentración de carbono total.

6.4.1.2. Análisis del contenido de carbono inorgánico

- A continuación, se inyectan 500 µL de muestra en una cámara de acidificación a una temperatura de 10 °C, la cual contiene ácido ortofosfórico (H₃PO₄) y se

burbujea continuamente gas O_2 . En esta cámara el carbono inorgánico presente en la muestra reacciona con el ácido ortofosfórico.

- El CO_2 producido de dicha reacción se transporta de igual manera que en el caso anterior, llegando al detector, que determina de esta forma el carbono inorgánico de la muestra.

Las medidas se realizaron por triplicado con sus desviaciones estándar, y el COD se obtuvo por diferencia de estos dos valores.

6.4.2. *Análisis de Pb*

El contenido de plomo en las muestras de aguas fue determinado mediante dos técnicas:

Espectroscopía de Emisión Atómica de Plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) utilizando el equipo IRIS Intrepid (Thermo Elemental, Reino Unido) con humidificador de Ar y cámara de nebulización ciclónica con nebulizador Conikal Seaspray (*Tabla A1.1., Anexo I*). Esta técnica se utilizó para medir Pb en las muestras de agua de los tanques con concentraciones de 0,640 y 6,40 mg/L de este metal.

Voltamperometría de redisolución anódica con diferencial de impulso (DPASV), utilizándose un electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE) como electrodo de trabajo, en el equipo electroquímico 757 VA Trace Analyzer de Metrohm (Herisau, Suiza) (*Figura 6*), mediante el protocolo del equipo establecido para ello (Application Bulletin 231/2 e).



Figura 6: *Equipo electroquímico para el análisis por DPASV con electrodo de gota colgante de Hg utilizado para el análisis de aguas*

Esta técnica permite la determinación simultánea de iones metálicos cuando las concentraciones son pequeñas dada su gran sensibilidad y bajos límites de detección,

siendo además aplicable a muestras de agua salinas. El contenido de plomo se analiza en dos etapas por DPASV.

Una primera *etapa de preconcentración* en la que se aplica un potencial de deposición de -1,15 V, al cual se reduce el ion en disolución hacia su forma metálica Pb^0 , que se deposita en la superficie del electrodo. Dicha etapa mejora sustancialmente el límite de detección de la técnica, pudiéndose realizar análisis de metales a nivel de trazas. Mientras se aplica este potencial, la disolución debe estar agitada para favorecer la preconcentración de la muestra mediante el transporte de iones metálicos desde el seno de la disolución hasta el electrodo. Posteriormente, se produce la *etapa de redisolución* en la que aplicando un barrido de potencial hacia valores más positivos que el potencial de deposición, se redissuelve el elemento por oxidación. De esta forma, el metal (Pb^0) previamente concentrado en el electrodo vuelve a la disolución en su forma oxidada $Pb(II)$. Durante este proceso de oxidación del metal, se obtienen picos de intensidad de corriente proporcionales a la concentración del catión metálico en la muestra. El registro de estas medidas electroquímicas se denomina voltamperograma (*Figuras A1.1. y A1.2., Anexo 1*). La cuantificación de la señal electroquímica se realizó mediante el método de la adición estándar, aplicando las condiciones instrumentales de medida optimizadas en función de la concentración de plomo de las muestras de agua (ver detalle en la *Tabla 1.2., Anexo 1*). Al ser una técnica muy sensible, se aplicó para las concentraciones de Pb más bajas de los bioensayos, correspondientes a las muestras de agua control y con adición de 0,0064 y 0,064 mg/L de Pb. Antes de estas medidas, el contenido en materia orgánica fue eliminado por digestión fotoquímica, pues puede quedar adsorbida en la gota y ser una interferencia durante la medida.

La digestión de las muestras se realizó en tubos de cuarzo con radiación ultravioleta y H_2O_2 (30% calidad Suprapur, Merck, Alemania), usándose para ello un equipo digestor Metrohm modelo 705 UV (Herisau, Suiza), con control de temperatura y refrigeración por agua. Para ello se pusieron 15 mL de muestra de agua en tubos de cuarzo a los que se añadieron 50 μ L de H_2O_2 en cada tubo, posteriormente se sometieron a irradiación con una lámpara de mercurio de 550 W durante 2 horas, controlando que la muestra no superara la temperatura de 78 °C evitando la ebullición y posible pérdida de muestra. A continuación, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se conservó en recipientes de poliestireno hasta su análisis por ASV.

El método de digestión y análisis empleado fue validado empleando la muestra de referencia certificada LGC-6016 de agua de estuario, con un valor certificado para plomo de $196 \pm 3 \mu\text{g/Kg}$. Los resultados fueron muy satisfactorios, teniendo la adecuada calidad analítica (ver Anexo 3)

6.5. Análisis del contenido metálico en tejidos de larvas

6.5.1. Pretratamiento de las muestras biológicas

El pretratamiento de las muestras de larvas que se aplicó antes de su análisis consistió en su liofilización y posterior digestión ácida. Así, las muestras biológicas fueron liofilizadas empleándose el equipo “FreeZone® Triad 7400030” (Cole-Parmer, Illinois U.S.A) (*Figura 7*). La liofilización es un proceso a través del cual se elimina el agua de las muestras congeladas mediante la conversión directa del agua congelada en vapor sin una formación intermedia de agua líquida (sublimación), dicho proceso es muy eficaz en la preparación, preservación y almacenamiento de productos biológicos debido a su naturaleza no destructiva.

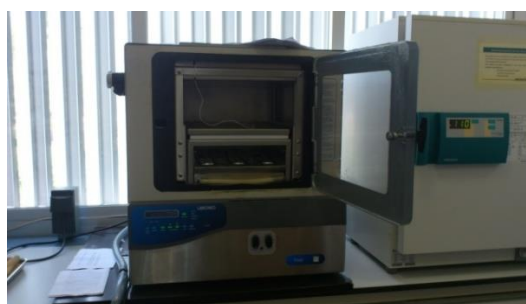


Figura 7: *Equipo de liofilización “FreeZone® Triad 7400030”*

El proceso de liofilización empleado con los tejidos de larvas fue optimizado realizándose en tres etapas (*Figura 8*):

- Una primera etapa de precongelación que dura 3 horas hasta alcanzar una temperatura de -55°C .
- Una etapa de desecación primaria que elimina la mayor parte del agua de los tejidos, la cual dura 18 horas hasta alcanzar -40°C .
- Una etapa final de desecación secundaria que elimina el agua intersticial de los tejidos, la cual dura 22 horas y acaba cuando se alcanza la temperatura de 14°C .

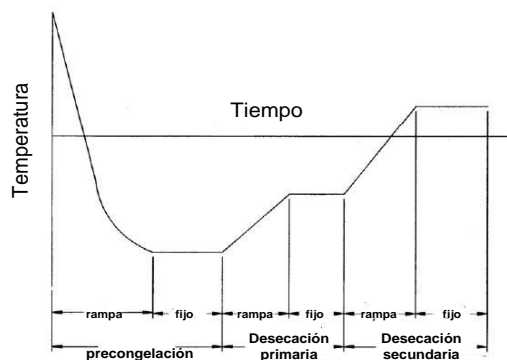


Figura 8: Esquema del ciclo de liofilización empleado

Tras el proceso de liofilización, las muestras fueron disueltas previa digestión ácida con 4 mL de HNO_3 y 2 mL de H_2O_2 , adicionado a las porciones de larvas liofilizadas de cada “pool” con pesos comprendidos entre 0,1 y 0,3 gramos.

La digestión ácida asistida por microondas se realizó en un equipo Ethos1600 (Milestone, Italia) (Figura 9), mediante un único programa en tres etapas: una primera etapa de 4 minutos a 200 vatios de potencia; una segunda etapa de 5 minutos a 400 vatios de potencia y una tercera etapa de 10 minutos a 600 vatios de potencia, tomándose la temperatura de 200 °C como temperatura de control durante todo el proceso.

Tras la digestión con microondas las muestras se dejaron enfriar y se enrasaron hasta 25 mL con agua desionizada (Milli-Q), conservándose en botes de poliestireno hasta su análisis.



Figura 9: Microondas Ethos 1600 utilizado para la digestión ácida de las muestras de larvas

6.5.2. Análisis de las muestras biológicas

El análisis de las muestras pretratadas fue realizado mediante Espectrometría de Masas con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente (espectrómetro de masas *X7 Series* con modo de trabajo con interfase Xi y antorcha con plasma “*screen*” (ICP-MS)) (Thermo Elemental, Reino Unido) (*Figura 10*).



Figura 10: *Equipo de ICP-MS Thermo X7 utilizado en el análisis de Pb en las muestras de larvas*

Las medidas fueron realizadas por calibración directa, utilizando los parámetros instrumentales optimizados para el análisis de plomo (*Tabla A2.1., Anexo 2*).

El método de digestión y análisis empleado fue validado empleando una muestra de referencia certificada de tejido de pez, DORM-2 (*Dogfish muscle certified reference material for trace metal*), con un valor certificado de plomo de $0,065 \pm 0,007$ mg/Kg de peso seco. Los resultados fueron muy satisfactorios, teniendo la adecuada calidad analítica (ver Anexo 3).

Resultados y discusión

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Parámetros físico-químicos en los tanques de los bioensayos

Durante el bioensayo se controlaron los parámetros de temperatura, pH, salinidad, sólidos disueltos totales (STD), conductividad y oxígeno disuelto del agua de los tanques donde fueron colocadas las larvas. Dichos parámetros se registraron in situ y diariamente para todos los tanques (0, 24, 48, 72 y 96 horas), siendo muy importante evitar que estos parámetros pudieran tener un efecto sobre las larvas que enmascarara el efecto de la adición de metal.

La temperatura regula procesos vitales de los organismos vivos como la respiración, el metabolismo o la reproducción, un aumento en sus valores produce una disminución de la solubilidad del oxígeno [Orozco y col., 2008]. Cabe destacar que valores de pH menores que 4 y mayores que 11 son tóxicos para los peces, considerándose el crecimiento de las especies como pobre con valores menores que 6 y mayores que 9, siendo únicamente aptos para la piscicultura los valores de pH entre 6,8 y 9 [Sandoval, 2007]. Uno de los parámetros de mayor interés en los estudios de calidad de aguas es el nivel de oxígeno disuelto, situándose su valor óptimo por encima de 5 mg/L ya que valores menores afectan el nivel de actividad, alimentación, crecimiento y reproducción, por ello es indispensable un control de la aireación de los tanques para evitar procesos de anoxia en los ejemplares [Sandoval, 2007]. La salinidad es considerada como la cantidad de sales presentes en disolución, ésta afecta a determinados procesos físicos del agua como la densidad, la tensión superficial o la solubilidad de gases. Los sólidos disueltos totales (SDT) corresponden a la cantidad de sustancias tanto de origen orgánico como inorgánico en forma molecular, ionizada o micro-granular, que contiene el agua, con un tamaño de partícula inferiores a 0,45 μm [Orozco y col., 2008; Sandoval, 2007].

Los valores de temperatura variaron entre 17,24 y 20,21°C; el pH osciló entre 7,24 y 9,37; el oxígeno disuelto estuvo comprendido entre 5,36 y 9,35 ppm; la conductividad osciló entre 48,10 y 52,56 mS/cm; los sólidos disueltos totales entre 27,62 y 29,57 g/L y la salinidad entre 36,75 y 39,68 g/L, no registrándose variaciones significativas tras los cuatro días de exposición. Para la supervivencia adecuada de los peces empleados en acuicultura, con características similares a los usados en el presente estudio, estos parámetros deben estar comprendidos entre los siguientes valores: temperatura y pH entre 16-24°C y 6,5-9, respectivamente; los valores de oxígeno disuelto deben estar por encima de 5 ppm; las conductividades ser aproximadas a 50 mS/cm, los sólidos disueltos totales en torno a 35 ppm con una salinidad de ≈ 35 g/L [Sandoval, 2007].

Respecto a los resultados obtenidos destacamos que todos los parámetros permanecieron dentro de los márgenes considerados adecuados para la supervivencia de las especies en estudio. En las Tablas A4.1, A4.2, A4.3, A4.4, A4.5 del *Anexo 4*, se recogen los valores obtenidos para cada parámetro físico-químico de las aguas de los bioensayos realizados con larvas de lubina.

7.2. Carbono orgánico disuelto (COD)

Además de estos parámetros físico-químicos, también se analizó el carbono orgánico disuelto de las muestras de agua a las 0, 24 y 96 horas, tal como se observa en la *Tabla 5*.

Tabla 5: Datos de COD para test de toxicidad de Pb en larvas de lubina

TANQUE	Tiempo (h)	COD (mg/L)	TANQUE	Tiempo (h)	COD (mg/L)
TQ 1	0	4,40 ± 0,76	TQ 6	0	3,60 ± 0,72
TQ 1	24	4,30 ± 0,59	TQ 11	96	9,20 ± 1,07
TQ 6	24	4,50 ± 0,52	TQ 16	96	7,10 ± 0,73
TQ 2	24	4,50 ± 0,61	TQ 12	96	7,50 ± 0,50
TQ 7	24	3,30 ± 0,71	TQ 17	96	6,70 ± 0,67
TQ 3	24	2,80 ± 0,71	TQ 13	96	23,00 ± 1,24
TQ 8	24	5,00 ± 0,87	TQ 18	96	20,00 ± 1,02
TQ 4	24	3,80 ± 0,27	TQ 14	96	9,80 ± 0,69
TQ 9	24	3,00 ± 0,65	TQ 19	96	11,20 ± 0,49
TQ 5	24	3,80 ± 1,27	TQ 15	96	23,90 ± 1,05
TQ 10	24	9,70 ± 0,86	TQ 20	96	---

El contenido en carbono orgánico disuelto fue determinado en las muestras de agua previamente filtradas. A las 0 horas sólo fueron tomadas muestras de agua de los dos tanques control puesto que el contenido en los demás tanques se supone igual para todos en ese momento.

Se puede observar como el contenido de materia orgánica disuelta en las aguas analizadas presentó un ligero incremento con el tiempo en la mayoría de los tanques, deduciéndose que las excreciones producidas por las larvas podían afectar de forma significativa a los tanques. Sin embargo, debido a que los niveles de carbono orgánico disuelto eran bajos en la mayoría de los tanques, no debieron provocar ningún efecto anómalo sobre dichas especies.

7.3. Análisis de plomo en agua

Los ejemplares de larvas de lubina fueron expuestos a diferentes concentraciones de acetato de plomo de 0,01; 0,1; 1 y 10 mg/L distribuidas en diferentes tanques tal como aparece en la *Tabla 6*, dichos valores entrarían dentro de la consideración de ambiente contaminado o muy contaminado lo cual permite observar el efecto del tóxico en poco tiempo.

Los tanques 1, 2, 3, 4 y 5 tenían su réplica correspondiente en los tanques 6, 7, 8, 9 y 10, así como los tanques 11, 12, 13, 14 y 15 estaban replicados respectivamente en el 16, 17, 18, 19 y 20, correspondiendo a una exposición de 24 y 96 horas, respectivamente.

En las *Tablas 6 y 7* se muestran los datos de plomo medidos por DPASV (tanques de menor concentración) y ICP-AES (tanques de mayor concentración) para los ensayos realizados.

Como se puede observar en las Figuras 11 y 12, el metal adicionado que inicialmente estaba disuelto evolucionó en el medio pasando a estar particulado, pudiendo depositarse en el fondo o adsorberse en las paredes de los tanques. Por ello, el efecto del metal adicionado será una consecuencia tanto de esta especie en su forma disuelta como en su forma particulada. La presencia de estos equilibrios metal disuelto \leftrightarrow metal particulado influye además en la variabilidad de las concentraciones del metal disuelto que fueron medidas, debido a que las concentraciones eran muy pequeñas.

Tabla 6: *Concentración de Pb ($\mu\text{g/L}$) en las muestras de agua medidas mediante DPASV*

Tanque	Concentración adicionada de Pb ($\mu\text{g/L}$)	Tiempo	Concentración media de Pb ($\mu\text{g/L}$)	Tanque	Concentración adicionada de Pb ($\mu\text{g/L}$)	Tiempo	Concentración media de Pb ($\mu\text{g/L}$)
TQ 1	Control	0 h	$2,5837 \pm 0,0905$	TQ 1	Control	24 h	$6,2032 \pm 0,3005$
TQ 6		0 h	$2,6702 \pm 0,0629$	TQ 6		24 h	$5,1557 \pm 0,2814$
TQ 2	6,4	0 h	$9,2912 \pm 0,9751$	TQ 2	6,4	24 h	$5,7852 \pm 0,0714$
TQ 7		0 h	$8,8317 \pm 0,1838$	TQ 7		24 h	$8,2162 \pm 0,3995$
TQ 3	64	0 h	$60,658 \pm 1,927$	TQ 3	64	24 h	$29,428 \pm 1,574$
TQ 8		0 h	$52,663 \pm 0,901$	TQ 8		24 h	$71,242 \pm 0,916$
TQ 11	Control	0 h	$3,0542 \pm 0,0346$	TQ 11	Control	96 h	$9,791 \pm 0,006$
TQ 16		0 h	$3,2627 \pm 0,1230$	TQ 16		96 h	$4,317 \pm 0,417$
TQ 12	6,4	0 h	$9,4137 \pm 0,3323$	TQ 12	6,4	96 h	$6,025 \pm 0,330$
TQ 17		0 h	$6,9792 \pm 0,3500$	TQ 17		96 h	$6,504 \pm 0,629$
TQ 13	64	0 h	$74,641 \pm 0,803$	TQ 13	64	96 h	$23,115 \pm 0,136$
TQ 18		0 h	$58,167 \pm 2,247$	TQ 18		96 h	$15,224 \pm 0,148$

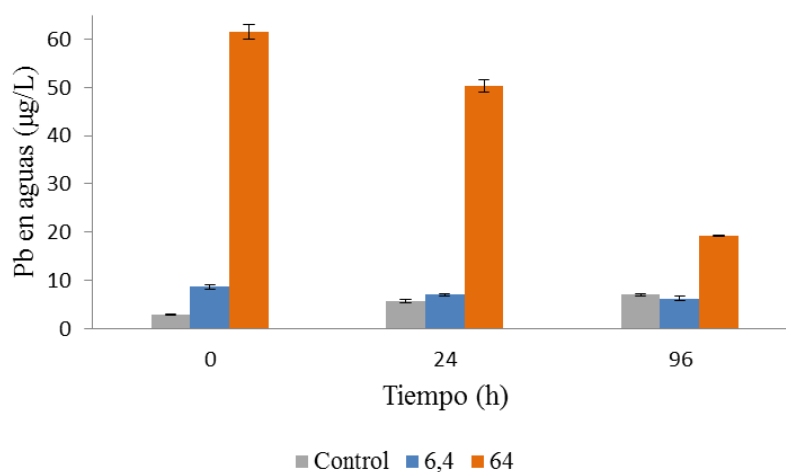


Figura 11: Concentraciones de Pb (µg/L) en las muestras de agua después de 0,24 y 96 h medidas por DPASV

Tabla 7: Concentración de Pb (mg/L) en las muestras de agua medidas mediante ICP-AES

Tanque	Concentración adicionada de Pb (mg/L)	Tiempo	Concentración media de Pb (mg/L)	Tanque	Concentración adicionada de Pb (mg/L)	Tiempo	Concentración media de Pb (mg/L)
TQ 4	0,637	0 h	0,6621 ± ,0293	TQ 4	0,637	24 h	0,4384 ± 0,0109
TQ 9		0 h	0,6647 ± ,0388	TQ 9		24 h	0,4087 ± 0,0079
TQ 5	6,369	0 h	4,7210 ± 0,021	TQ 5	6,369	24 h	1,9500 ± 0,035
TQ 10		0 h	5,9820 ± 0,048	TQ 10		24 h	2,0560 ± 0,026
TQ 14	0,637	0 h	0,6373 ± 0,031	TQ 14	0,637	96 h	0,3401 ± 0,0073
TQ 19		0 h	0,6463 ± ,0035	TQ 19		96 h	0,3111 ± 0,0103
TQ 15	6,369	0 h	6,3140 ± 0,037	TQ 15	6,369	96 h	0,7838 ± 0,0039
TQ 20		0 h	6,0220 ± 0,067	TQ 20		96 h	-

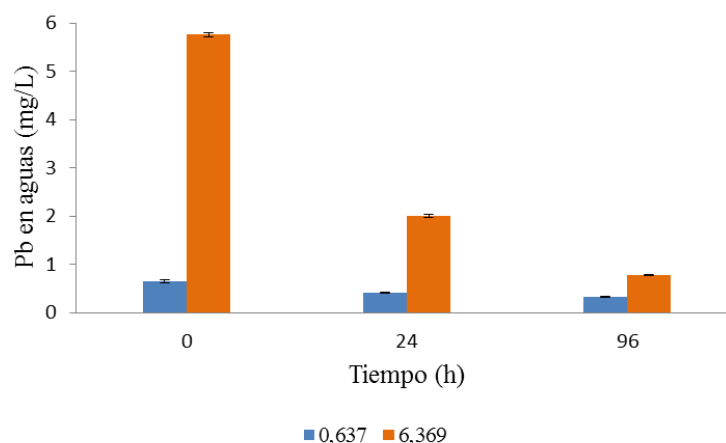


Figura 12: Concentraciones de Pb ($\mu\text{g/L}$) en las muestras de agua después de 0,24 y 96 h medidas por ICP-AES

7.4. Análisis de plomo en larvas de lubina

Para el análisis de las muestras de larvas de lubina se realizaron dos réplicas de cada tanque, exceptuando aquellos casos en los que no se pudo completar el segundo “pool” debido al número de ejemplares muertos. Para disponer de un valor de referencia del nivel de plomo en las larvas que aún no habían sido sometidas a los test de bioacumulación se tomaron muestras de la pecera general a las 0 h, obteniéndose un valor medio de $0,1419 \pm 0,151$ mg/Kg para dos réplicas.

Los resultados obtenidos en el análisis de plomo de las muestras del bioensayo se recogen en la Tabla 8 expresados como valor medio de concentración en mg/Kg de peso seco de larva.

Tabla 8: Concentración de Pb (mg/Kg) en larvas de lubina expuestas a diferentes [Pb]

Tanque	Concentración de Pb adicionada (mg/L)	Tiempo (h)	Pb (mg/Kg) en larvas	Tanque	Concentración de Pb adicionada (mg/L)	Tiempo (h)	Pb (mg/Kg) en larvas
TQ 1	Control	24	$0,1416 \pm 0,0038$	TQ 11	Control	96	$0,1149 \pm 0,0426$
TQ 6			$0,1097 \pm 0,0121$	TQ 16			$0,1171 \pm 0,047$
TQ 2	0,0064	24	$0,2938 \pm 0,0512$	TQ 12	0,0064	96	$0,3512 \pm 0,0284$
TQ 7			$0,3295 \pm 0,043$	TQ 17			$0,3069 \pm 0,0398$
TQ 3	0,064	24	$0,7588 \pm 0,0514$	TQ 13	0,064	96	$4,9017 \pm 2,3195$
TQ 8			$3,139 \pm 2,8938$	TQ 18			$4,3880 \pm 2,629$
TQ 4	0,637	24	$3,9714 \pm 0,1918$	TQ 14	0,637	96	$16,2601 \pm 0,7244$
TQ 9			$4,3835 \pm 0,6958$	TQ 19			$16,3026 \pm 0,6886$
TQ 5	6,369	24	$47,410 \pm 9,474$	TQ 15	6,369	96	---
TQ 10			$274,3 \pm 36,03^*$	TQ 20			---

Puede observarse que al aumentar la concentración de plomo en las aguas se produce un incremento en el contenido de metal en las larvas. Dicha tendencia es moderada cuando la cantidad de metal adicionada al agua es baja, aumentando significativamente en los ejemplares expuestos a los valores mayores de concentración. Destaca, por último, la alta mortalidad en los ejemplares expuestos a la mayor concentración estudiada, la cual impide que las larvas sobrevivan después de 5 días de exposición.

Con respecto al tiempo de exposición, se observa que existe un aumento de la acumulación metálica en las larvas al aumentar el tiempo de exposición para la mayoría de las concentraciones ensayadas, siendo este efecto más acusado para el caso de la mayor concentración estudiada.

En la Figura 13 se han representado los valores de Pb bioacumulados frente a la concentración de Pb adicionada en el agua de los tanques, observándose claramente la bioacumulación del metal en función de la concentración del medio y del tiempo.

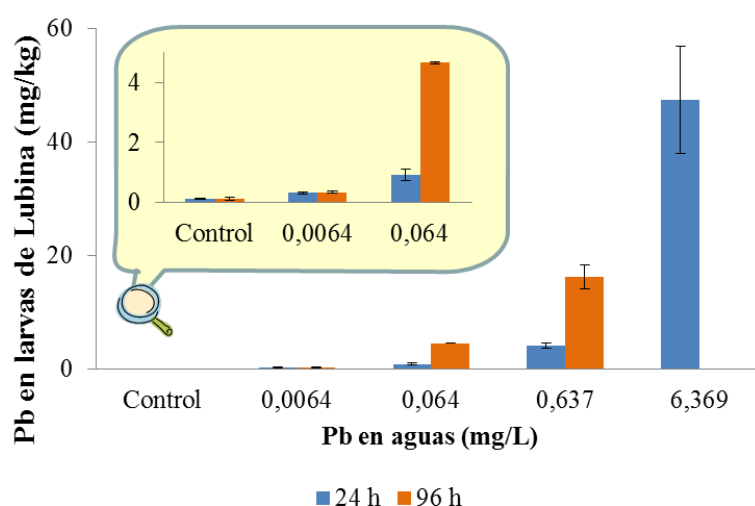


Figura 13: Concentración media de Pb (mg/Kg) en larvas de lubinas a las 24 y 96 h con respecto a la concentración de Pb adicionado en el agua de los tanques

7.5. Estudio comparativo de bioacumulación de Pb con larvas de dorada

Debido a que este trabajo de fin de grado se ha realizado dentro de un proyecto más amplio en el grupo de investigación de Geoquímica Marina, se pudo disponer de un estudio paralelo de bioacumulación realizado con ejemplares de larvas de dorada (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758). En las Figuras 14 y 15 se ha representado una

comparativa de los valores medios de bioacumulación de plomo en las larvas de dorada y lubina realizando los bioensayos de igual forma.

A partir de los resultados disponibles se estudiaron las diferencias significativas de bioacumulación entre ambas especies. Para ello se evaluó en primer lugar la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro Wilks, obteniéndose que los datos no seguían una distribución normal. Mediante transformación de los datos ($\log x$, y $\ln x$) se pudo disponer de una distribución normal aunque no homogénea. Por ello, se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar la bioacumulación en ambos tipos de larvas, obteniéndose valores de “p” superiores a 0,05 ($p > 0,05$), indicando que no existen diferencias significativas a ese nivel de probabilidad para la acumulación de plomo entre ambas especies. No obstante, a partir de las figuras de la bioacumulación en larvas frente al plomo adicionado en el agua (Figuras 14 y 15), puede observarse un mayor efecto de este contaminante en las larvas de dorada a las 24 h, siendo mayor a las 96 h para las larvas de lubina, no llegando a sobrevivir expuestas a la mayor concentración de plomo adicionada.

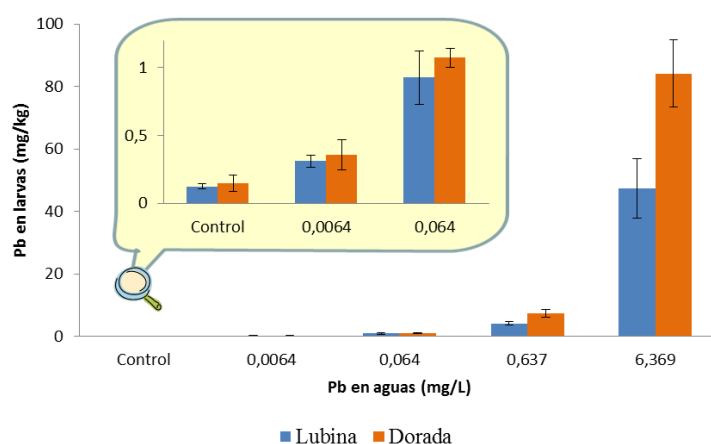


Figura 14: Comparativa de las concentraciones de Pb (mg/Kg) en larvas de dorada y lubina a las 24h con respecto a la concentración de Pb adicionado en el agua

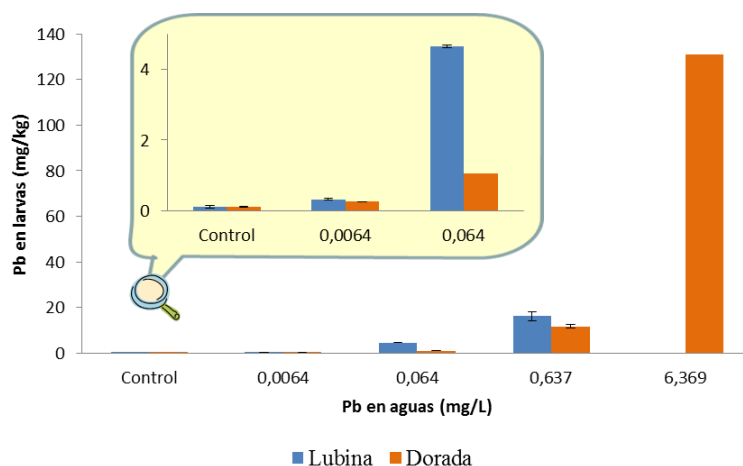


Figura 15: Comparativa de las concentraciones de Pb (mg/Kg) en larvas de dorada y lubina a las 96h con respecto a la concentración de Pb adicionado en el agua

Conclusiones

8. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta todos los resultados que se han obtenido en el presente trabajo de fin de grado, se pueden enumerar como principales conclusiones las que se indican a continuación:

- Se ha realizado un estudio sobre bioacumulación por plomo en larvas de lubina de gran valor comercial mediante bioensayos de toxicidad aguda, utilizando la adición de acetato de plomo ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) en el medio acuático.
- Se ha realizado el control diario de los parámetros físico-químicos del medio. A partir de estos resultados puede decirse que las condiciones en las que se realizaron los ensayos son adecuadas para la supervivencia de los individuos en los tanques.
- Se ha realizado un control de los niveles de plomo disuelto en el agua de los tanques en relación con el adicionado. El metal adicionado disminuye de forma significativa con el tiempo, por lo que la acumulación producida se debe al metal en forma disuelta y particulada.
- Se han cuantificado los niveles de concentración de metales en larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*), determinándose que se produce una bioacumulación significativa del plomo a valores altos de concentración, así como al aumentar el tiempo de exposición.

- Además se ha realizado un estudio comparativo con larvas de dorada, llegando a la conclusión de que no existen diferencias significativas entre las pautas de acumulación de ambas especies en estado larvario.
- Por último se puede decir que con el presente trabajo de Fin de Grado se ha ampliado el conocimiento que se tiene sobre el efecto de plomo en larvas de lubina en procesos de contaminación.

Bibliografía

- Apte, S.C., Batley, G., Maher, W.A., (2002). *Environmental monitoring handbook. Chapter 6: Monitoring of trace metals and metalloids in natural waters*. Ed. McGraw-Hill, NY, USA.
- Berkowitz, B., Dror, I., Yaron, B., (2008). *Contaminant Geochemistry. Interactions and transport in the subsurface environment*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Cámara, C., Pérez-Conde, C. (2011). *Análisis químico de trazas*. Ed. Síntesis, España.
- Campbell, P.G.C., Errécalde, O., Fortín, C., Hiriart-Baer, V.P., Vigneult, B., (2002). *Metal bioavailability to phytoplankton. Applicability of the biotic ligand model*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 133, 189 - 206.
- Censi, P., Spoto, S.E., Saiano, F., Sprovieri, M., Mazzola, S., Nardone, G., Di Geronimo, S.I., Punturo, R., Ottonello, D. (2006). *Heavy metals in coastal water Systems. A case study from the northwest gulf of Thailand*. Chemosphere, 64, 1167-1176.
- Cerviño, A. Cervera, A., Pérez, C., (2007). *XI Congreso de acuicultura*. Xunta de Galicia (España)
- Crompton, T. (2007). *Toxicants in aqueous ecosystems. A guide for the analytical and environmental chemist*. Springer-Verlag, Berlín (Alemania).
- Danion M., LeFloch, S., Lamour, F., Guyomarch, J., Quentel, C. (2011). *Bioconcentration and immunotoxicity of an experimental oil spill in European seabass (Dicentrarchus labrax L.)*. Ecotoxicology and Environmental Safety 2167–2174.
- De Domenico, E., Mauceri, A., Giordano, D., Maisano, M., Giannetto, A., Parrino, V., Natalotto, A., D'Agata, A., Cappello, T., Fasulo, S. (2013).

- Biological responses of juvenile European sea bass (Dicentrarchus labrax) exposed to contaminated sediments.* Ecotoxicology and Environmental Safety, 114-123.
- Domènech, X, Peral, J. (2006). *Química Ambiental de sistemas terrestres*. Ed. Reverté, España.
 - Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K., Wood, W. (2007). *Framework for Metals Risk Assessment*. Ecotoxicology and Environmental Safety 68, 145-227
 - Förstner, U., Wittmann, G.T.W. (1979). *Metal pollution in the aquatic environment*. (New York) Springer-Verlag, Berlín Heidelberg.
 - Jones, S. (2009). *Information Resources in Toxicology (Fourth Edition)*, Chapter 23: Environmental Toxicology: Aquatic. Ed. Elsevier.
 - Miller, J., Miller, J. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ª Edición*. Madrid. Ed. Pearson Educación.
 - Nordberg, M., Templeton, D.M., Andersen, O., Duffus, J.H. (2009). *Glossary of terms used in ecotoxicology (IUPAC Recommendations 2009)*. Pure and Applied Chemistry 81, 829-970.
 - Ortega, A. (2013). *Cultivo de Lubina (Dicentrarchus labrax)*. Ed. Fundación observatorio español de acuicultura.
 - Orozco-Barrenetxea, C., Pérez-Serrano, A., González-Delgado, M.N., Rodríguez-Vidal, F.J., Alfayate-Blanco, J.M. (2008). *Contaminación ambiental*. Ed. International Thomson. Madrid, España.
 - Ossana, N. (2011). *Biomarcadores de contaminación acuática: estudios en los ríos Luján y Reconquista*. Universidad de Buenos Aires
 - Rorabacher, D. (1991). *Statistical Treatment for Rejection of Deviant Values: Critical Values of Dixon's "Q" Parameter and Related Subrange Ratios*. Analytical Chemistry 63, 139-146.
 - Sandoval, J.A. (1997). *Fundamentos de piscicultura continental y calidad de aguas naturales*. Universidad del Cauca. Buenos Aires, Argentina.
 - Stanley E. Manahan (1993). *Fundamentals of Environmental Chemistry*. Ed. Lewis Publisher.
 - Whitfield, M., Turner, D.R. (1987). *The role of particles in regulating the composition of seawater*. Aquatic Surface Chemistry. Ed. W. Stumm: John Wiley & Sons, New York.

- Yaman, M., Yaman, I.H. (2014). *Variations in toxic metal levels of two fish species, Pomatomus saltatrix and Dicentrarchus labrax, and risk estimation for children.* Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi/Spectroscopy and Spectral Analysis, 34 (2), pp. 300-307.
- Yaman, M., Yaman, I.H. (2013). *Determination of trace metal levels of Cd, Pb, Cr, Ni, and Cu in two fish species by STAT-AAS and ICP-AES.* Atomic Spectroscopy, 34 (5), pp. 191-198.

Anexo 1. Análisis de Pb en aguas**Tabla A1.1.:** *Parámetros instrumentales utilizados en el análisis de Pb en las muestras de agua por ICP-AES*

Variables	Valor
Longitud de onda (nm)	193,759
Longitud de onda del patrón interno (nm)	224,306
Velocidad de la bomba (rpm)	100
Presión del nebulizador (PSI)	15
Caudal del gas plásmogeno (Ar) (L/min)	14
Caudal del gas auxiliar (Ar) (L/min)	1,5
Caudal de purga (L/min)	2
Potencia de la bobina (W)	1350
Número de réplicas	4

Tabla A1.2.: *Parámetros instrumentales utilizados en el análisis de Pb en las muestras de aguas por DASV*

Etapas	Variables	Valor
	Velocidad de agitación (rpm)	2000
	Tiempo de purga con N2 (s)	300
	Tamaño de gota (ua)	4
Deposición	Potencial de deposición (mV)	-1,15
	Tiempo de limpieza (s)	0
	Tiempo de deposición (s)	90
	Tiempo de equilibrio (s)	10
Barrido	Tiempo de pulso (V)	0,04
	Amplitud de impulsos (V)	0,05
	Potencial de inicio (V)	-1,15
	Potencial final (V)	0,05
	Salto de potencial (V)	0,06
	Tiempo de salto de potencial (s)	0,1
	Velocidad de barrido (V/s)	0,06
	Potencial de pico de Pb (II)	0,45

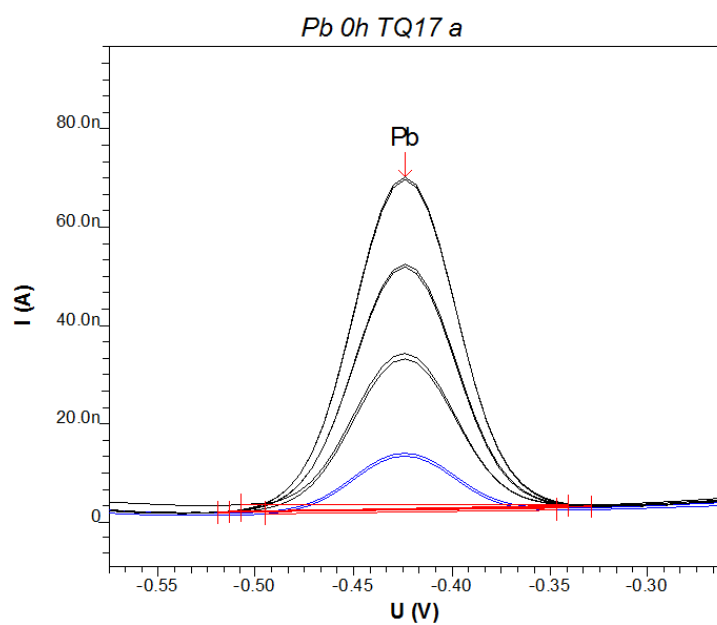


Figura A1.1.: Ejemplo de voltamperograma obtenido durante el análisis de Pb por ASV (concentración Pb 0,0064 mg/L y adiciones de 0,0065 mg/L)

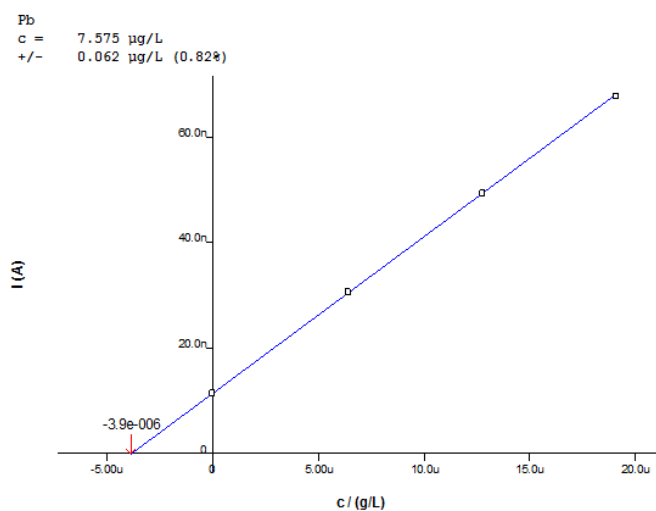


Figura A1.2.: Ejemplo de curva de calibración obtenida en la etapa de redisolución de ASV en una concentración de 0,0064 mg/L de Pb

Anexo 2. Análisis de Pb en las muestras biológicas

Tabla A2.1.: *Parámetros instrumentales para la medida de Pb en muestras de larvas previamente digeridas y analizadas por ICP-MS*

Variables	Condiciones
Isótopo de medida	^{208}Pb
Caudal de CCT (H27%/He) (mL/min)	2,5 mL/min
Barridos	200
Tiempo de permanencia (ms)	10 ms
Presión del nebulizador (PSI)	0,84 psi
Barrera de potencial KED (V)	3
Caudal del gas plasmógeno (Ar) (L/min)	13
Caudal del gas auxiliar (Ar) (L/min)	0,8
Velocidad de la bomba peristáltica (rpm)	20
Potencia (W)	1400
Número de réplicas	4

Anexo 3. Validación de los métodos

Una de las características más importantes que debe ofrecer un método analítico es estar libre de errores sistemáticos. Esto significa que el valor obtenido para la cantidad de analito debería ser el valor verdadero. Sin embargo, incluso si no existieran errores sistemáticos, los errores aleatorios hacen poco probable que la cantidad medida sea exactamente igual que la cantidad conocida. Para decidir si la diferencia entre ambas cantidades se puede atribuir a errores aleatorios se suele emplear algún contraste de significación entre el valor obtenido y el valor de referencia.

Por ello, en este trabajo se validaron las medidas de análisis de agua y de larvas mediante el empleo de muestras de referencia, aplicando el test de comparación de una media experimental con un valor conocido [Miller y Miller, 2002].

Para ello se establece la hipótesis nula H_0 , en la que se considera que el método analítico no está sujeto a errores sistemáticos, es decir, que no hay otra diferencia entre el valor observado y el conocido. Para contrastar H_0 , se calcula el estadístico t:

$$t = \frac{(\bar{x} - \eta) \cdot \sqrt{n}}{s}$$

donde “ \bar{x} ” es la media muestral, “ η ” es la media de la población, “ s ” la desviación estándar muestral y “ n ” el número de muestras.

Como muestras de referencia para el análisis de plomo en las larvas se utilizó la muestra DORM-2 (Dogfish muscle certified reference material for trace metal), con un valor certificado para plomo de $0,065 \pm 0,007$ mg/Kg, a la que se aplicó la misma metodología de digestión y análisis que las muestras de los bioensayos .

Tabla A3.1.: Resultados del análisis de Pb de la muestra de referencia de tejido DORM-2 analizada por ICP-MS (mg/Kg) ($n=3$)

Datos	Media	Desviación estándar
0,055	0,062	0,016
0,081		
0,051		

Antes de proceder al cálculo del estadístico t, se aplicó el test de la Q-Dixon [Rorabacher, 1991] para evaluar si el dato más alejado de la media era un valor anómalo entre los datos obtenidos y proceder en dicho caso a su descarte. De este estudio se comprobó que no existían diferencias significativas entre el dato sospechoso y el resto, por lo que se tuvieron en cuenta todos los valores para el cálculo de la media y la desviación estándar. Al sustituir estos valores en la expresión inicial para la t de Student se llegó a:

$$t = \frac{|(0,065 - 0,062)|}{0,016} \cdot \sqrt{3} = 0,272$$

Comparando este valor con el valor crítico de la t de Student para un 95% de nivel de confianza y 2 grados de libertad, que es $t_2=4,303$, se pudo comprobar que el valor tabulado era mayor que el calculado. Por tanto, no se rechaza la hipótesis nula (H_0 : la

media muestral y la media de la población son iguales), es decir, no hay evidencia de error sistemático, o lo que es lo mismo la diferencia observada no es estadísticamente significativa.

Para la validación del método para el análisis de Pb en agua se empleó la muestra de referencia LGC-6016 (muestra de referencia de agua de estuario), con un valor certificado para plomo de $196 \pm 3 \mu\text{g/Kg}$. Esta muestra fue analizada por DPASV al igual que las muestras de los bioensayos .

Tabla A3.2.: *Resultados del análisis de Pb de la muestra de referencia de agua LGC-6016 por DP-ASV ($\mu\text{g/Kg}$) ($n=2$)*

Datos	Media	Desviación estándar
199,05	196,25	3,96
193,45		

Al sustituir estos valores en la expresión inicial para la t de Student se llegó a:

$$t = \frac{|(196,25 - 196)|}{3,96} \cdot \sqrt{2} = 0,088$$

El valor crítico de la t de Student para un 95% de nivel de confianza y 1 grado de libertad es $t_1=12,71$, por lo que igualmente se puede aceptar la hipótesis nula no existiendo diferencias significativas entre el dato conocido y el resultado de los análisis, validándose también el método para el análisis de Pb en las aguas.

Anexo 4. Tabla Parámetros físico-químicos.

Tabla A4.1. Parámetros físico-químicos de las aguas para los test de toxicidad de Pb a las 0h

[Pb] mg/L	Test	TANQUE	T (°C)	pH	O ₂ % saturación	O ₂ ppm	Conductividad (mS/cm)	STD (g/L)	Salinidad (g/L)
Control	24h	TQ 1	19,4	9,11	90,5	8,04	51,32	28,71	38,33
		TQ 6	19,42	8,39	93,9	8,44	50,87	28,43	37,96
	96h	TQ 11	19,32	8,25	92,2	8,34	50,76	28,44	38
		TQ 16	19,42	8,18	93,6	8,34	50,89	28,43	37,93
	24h	TQ 2	19,49	8,13	91,9	8,1	50,35	28,15	37,59
		TQ 7	19,5	8,2	94,7	8,48	50,69	28,3	37,74
0,0064	96h	TQ 12	19,53	8,18	94,1	8,98	51,37	28,61	38,17
		TQ 17	19,66	8,16	94,1	8,46	51,26	28,46	37,97
0,064	24h	TQ 3	19,77	9,3	89,1	7,38	50,2	27,91	37,18
		TQ 13	19,65	9,13	90,9	8,17	50,71	28,19	37,57
	96h	TQ 8	19,39	8,95	93,5	8,11	50,78	28,39	37,88
		TQ 18	19,49	8,98	93,1	8,39	51,1	28,49	38
	24h	TQ 4	19,37	9,74	94,8	8,42	51,17	28,61	38,19
		TQ 9	19,63	9,34	92,1	8,16	50,52	28,12	37,46
0,637	96h	TQ 14	19,45	9,37	92,3	8,29	50,16	28,04	37,37
		TQ 19	19,4	9,14	94,3	8,52	50,93	28,44	37,94
6,369	24h	TQ 5	19,31	9,23	93,8	8,26	50,69	28,4	37,87
		TQ 15	19,48	9,3	92,9	8,31	50,15	27,97	37,25
	96h	TQ 10	19,49	8,59	92,4	8,42	50,52	28,16	37,5
		TQ 20	19,58	8,56	92,9	7,36	49,63	28,09	37,46

Tabla A4.2. Parámetros físico-químicos de las aguas para los test de toxicidad de Pb a las 24 horas

TANQUE	T (°C)	pH	O ₂ % saturación	O ₂ ppm	Conductividad (mS/cm)	STD (g/L)	Salinidad (g/L)
TQ 1	18,88	9,14	99,8	7,14	52,39	29,57	39,68
TQ 6	19,16	8,85	99,9	7,12	52,56	29,54	39,6
TQ 11	19,36	8,55	99,2	8,75	52,14	29,13	38,98
TQ 16	19,54	8,44	98,8	8,83	52,4	29,19	39
TQ 2	19,27	8,55	99,4	6,91	51,8	29,06	38,97
TQ 7	19,29	9,07	99,2	8,74	49,37	29,31	39,28
TQ 12	19,28	8,83	98,4	8,82	52,28	29,45	38,43
TQ 17	19,41	8,66	99,1	8,84	52,03	29,25	38,94
TQ 3	19,21	10,13	99,3	8,89	50,47	29,21	39,13
TQ 13	19,21	8,79	97,5	6,62	51,73	29,09	38,94
TQ 8	19,33	9,31	99,3	7,08	52,04	29,16	39,09
TQ 18	19,11	8,67	98,2	8,68	50,86	29,07	39
TQ 4	20,08	8,36	98,6	8,85	51,83	28,58	38,8
TQ 9	20	8,59	98,9	8,96	52,25	28,87	38,59
TQ 14	18,91	8,71	99,7	9,08	51,6	29,18	39,07
TQ 19	19,27	8,01	99,2	9	51,32	28,8	38,55
TQ 5	19,75	9,83	99,6	6,97	52,07	28,89	38,65
TQ 15	19,49	8,62	98,4	6,98	51,64	28,75	38,44
TQ 10	19,73	9,16	98,6	8,76	51,33	28,82	38,78
TQ 20	18,99	8,64	99,4	8,92	51,34	28,96	38,79

*Las condiciones de estudio de los tanques se describen en las columnas 1ª y 2ª de la Tabla A4.1

Tabla A4.3. Parámetros físico-químicos para los test de toxicidad de Pb a las 48 horas

TANQUE	T (°C)	pH	O ₂ % saturación	O ₂ ppm	Conductividad (g/L)	STD (g/L)	Salinidad (g/L)
TQ 11	20,02	8,13	99,5	8,75	51,08	28,3	37,7
TQ 16	20,08	8,02	99,1	8,58	51,58	28,5	38
TQ 12	20,06	8,02	98,2	8,57	51,55	28,1	37,95
TQ 17	20,21	7,9	97	8,59	50,31	28,3	37,61
TQ 13	19,67	7,47	98,02	8,83	50,22	28,3	37,9
TQ 18	19,77	7,45	83,01	7,39	50,67	28,2	37,6
TQ 14	19,28	8,18	95,09	8,61	50,78	28,5	38,13
TQ 19	19,63	7,94	94,05	8,49	50,66	28,2	37,62
TQ15	20,39	7,68	98,3	8,46	51,43	28,1	37,52
TQ 20	20,03	8,09	98,3	8,81	51,05	28,2	37,62

*Las condiciones de estudio de los tanques se describen en las columnas 1ª y 2ª de la Tabla A4.1

Tabla A4.4. Parámetros físico-químicos para los test de toxicidad de Pb a las 72 horas

TANQUE	T (°C)	pH	O ₂ % saturación	O ₂ ppm	Conductividad (mS/cm)	STD (g/L)	Salinidad (g/L)
TQ 11	19,48	8,03	99,7	7,11	50,95	28,48	38,05
TQ 16	19,64	7,77	98,7	6,99	50,4	28,12	37,49
TQ 12	19,4	8	98,6	7,07	51,27	28,57	38,03
TQ 17	19,53	8,21	98,8	7,03	50,52	28,51	37,64
TQ 13	19,26	7,24	85,2	5,36	50,5	28,44	38,01
TQ 18	19,17	7,42	98,2	6,92	50,47	28,67	38,26
TQ 14	18,87	8,28	99,6	7,21	50,88	28,84	38,59
TQ 19	19,16	7,97	99	7,1	50,12	28,25	37,69
TQ 15	19,26	8,2	99,3	7,07	50,73	28,5	38,06
TQ 20	19,82	7,6	93,4	5,83	50,66	28,06	37,39

*Las condiciones de estudio de los tanques se describen en las columnas 1ª y 2ª de la Tabla A4.1

Tabla A4.5. Parámetros físico-químicos para los test de toxicidad de Pb a las 96 horas

TANQUE	T (°C)	pH	O ₂ % saturación	O ₂ ppm	Conductividad (mS/cm)	STD (g/L)	Salinidad (g/L)
TQ 11	20,08	7,96	99,7	7,08	52,29	28,85	38,57
TQ 16	20,21	7,73	99,5	7,06	51,66	28,51	38,12
TQ 12	19,98	8,1	99,9	7,08	52,51	29,02	38,82
TQ 17	20,11	8	99,5	7,07	51,98	28,7	38,38
TQ 13	19,73	7,27	97,7	7,02	51,18	28,43	38,01
TQ 18	19,64	7,47	98,9	7,08	50,37	28,05	37,41
TQ 14	19,68	8,17	99,9	7,12	52,24	29,05	38,87
TQ 19	19,7	8,21	99,9	7,13	52,04	28,94	38,69
TQ15	20,13	8,15	85,3	6,05	51,66	28,49	38,09
TQ 20	--	--	--	--	--	--	--

*Las condiciones de estudio de los tanques se describen en las columnas 1ª y 2ª de la Tabla A4.1